BD Fluid Thioglycollate Medium (FTM)

APPLICATION

Le **BD Fluid Thioglycollate Medium** (milieu thioglycolate liquide) est un milieu d'enrichissement liquide polyvalent utilisé dans des procédures qualitatives pour le test de stérilité, l'isolement et la culture d'aérobies, d'anaérobies et de microaérophiles modérément exigeants. En microbiologie clinique, il peut être utilisé comme milieu d'enrichissement des échantillons cliniques.

PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE

Méthode microbiologique.
Le Fluid Thioglycollate Medium a été élaboré par Brewer pour la culture rapide d'anaérobies et d'aérobies.[1] L'incorporation de la peptone de caséine fut effectuée par Vera en 1944.[2]
Ce milieu favorise la croissance d'un grand nombre de microorganismes, notamment d'anaérobies stricts, sans aucune incubation, dans une atmosphère anaérobie. En plus de sa faculté à diminuer le potentiel d'oxydoréduction, le thioglycolate de sodium a la capacité de neutraliser l'activité antibactérienne des composés mercuriels. Ces caractéristiques rendent le FTM très utile pour la mise en évidence de contamination dans des matériaux biologiques et autres. En raison de sa propriété de promotion de croissance, cette formulation a été adoptée par la pharmacopée américaine (USP), l'AOAC et la pharmacopée européenne (EP) comme test de stérilité et milieu d'enrichissement.[3-6] Le Fluid Thioglycollate Medium est largement utilisé comme milieu d'enrichissement en microbiologie clinique, en particulier pour traiter des échantillons provenant de sites anatomiques à stérilité primaire.[7]
Cependant, son faible potentiel d'oxydoréduction ne fait pas du **BD Fluid Thioglycollate Medium** un milieu adapté pour les aérobies stricts tels que les non-fermentants, *Micrococcus* et les microorganismes similaires. Pour ces microorganismes, il convient d'utiliser plutôt un Tryptic Soy Broth ou un Brain Heart Infusion Broth.

Dans le **BD Fluid Thioglycollate Medium**, le glucose, la peptone et l'extrait de levure fournissent les facteurs de croissance nécessaires à la croissance bactérienne. Le thioglycolate de sodium et la L-cystine sont des agents réducteurs qui empêchent l'accumulation de peroxydes, qui sont létales pour certains microorganismes. La résazurine est un indicateur d'oxydoréduction, rose lorsqu'il est oxydé et incolore lorsqu'il est réduit. La quantité réduite de gélose aide à maintenir un faible potentiel redox en stabilisant le milieu contre les courants de convection, et en conservant ainsi l'anaérobiose dans les couches profondes du milieu.[8] Les composants gélosés du Fluid Thioglycollate Medium lui confèrent généralement un aspect légèrement opaque.

Le milieu prêt à l'emploi décrit dans le présent document est rempli sous un jet d'azote gazeux, ce qui entraîne une décoloration de l'indicateur résazurine. Toutefois, il est possible de l'utiliser jusqu'à ce que 30 % environ du milieu (couche supérieure) soit oxydé, comme indiqué par une coloration rose de la résazurine près de la surface. Si l'oxydation a dépassé ce stade, le bouillon peut être réchauffé une fois à la vapeur ou au bain-marie, refroidi et utilisé.
L'USP autorise la présence d'eau dans le glucose (dextrose) et indique un dosage de 5,5 g pour la formulation.[3] La présence d'humidité n'étant pas souhaitée dans un milieu déshydraté, une quantité équivalente de glucose est incorporée au milieu dans sa forme anhydre.

REACTIFS

BD Fluid Thioglycollate Medium (FTM)

Formule* par litre d'eau purifiée

Extrait de levure	5,0 g	Chlorure de sodium	2,5 g
Digestion pancréatique de caséine	15,0	Thioglycolate de sodium	0,5
Glucose (anhydre)	5,0	Résazurine	0,001
L-cystine	0,5	Gélose	0,75

pH 7,1 ± 0,2

*Ajustée et/ou complémentée en fonction des critères de performances imposés.

PRECAUTIONS

IVD . A usage professionnel uniquement.

Ne pas utiliser de fioles présentant des signes de contamination microbienne, décoloration, dessiccation ou fissure, ou d'autres signes de détérioration.

Consulter le document **MODE D'EMPLOI GENERAL** pour plus d'informations sur les procédures de manipulation aseptique, les risques biologiques et l'élimination des produits usagés.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver les fioles dans l'obscurité entre 2 et 8 °C jusqu'au moment de leur utilisation. Ne pas les congeler ni les surchauffer. Les fioles peuvent être ensemencées jusqu'à la date de péremption indiquée (voir l'étiquette du récipient ou de l'emballage), et incubées pendant les durées recommandées.

Les fioles provenant de boîtes déjà entamées peuvent être utilisées jusqu'à la date de péremption indiquée. Les fioles ouvertes doivent être utilisées immédiatement.

CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Tester les échantillons avec les microorganismes indiqués dans le tableau ci-dessous. Pour être conforme aux normes USP et EP, un inoculum de 10 à 100 UFC par récipient doit être utilisé.[3-5] La pharmacopée européenne prescrit d'incuber les récipients entre 30 et 35 °C pour une durée maximale de 3 jours, à l'air ambiant. Pour obtenir une croissance optimale des aérobies stricts, les fioles doivent être ventilées pendant l'incubation. Pour ce faire, il suffit de desserrer légèrement les bouchons.

Souche de test	**Croissance attendue (turbidité)***
Staphylococcus aureus ATCC 6538	+++ ou supérieure
Micrococcus luteus ATCC 9341	++ ou supérieure
Bacillus subtilis ATCC 6633	++ ou supérieure
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	+++ ou supérieure
Clostridium sporogenes ATCC 19404	+++ ou supérieure
Clostridium sporogenes ATCC 11437	+++ ou supérieure
Bacteroides vulgatus ATCC 8482	+++ ou supérieure
Sans ensemencement	Transparente à légèrement opalescente, couleur ambre clair, la couche supérieure peut être rose

* ++++ = opaque, dense +++ = opalescent, dense ++ = opalescent + = voile léger

METHODE

Matériaux fournis

BD Fluid Thioglycollate Medium fourni en fioles (voir **CONDITIONNEMENT** pour plus d'informations).

STERILE

Matériaux non fournis

Milieux de culture auxiliaires, réactifs et matériel de laboratoire requis.

Types d'échantillons
Le BD Fluid Thioglycollate Medium peut être utilisé comme milieu d'enrichissement pour tous les types d'échantillons cliniques et non cliniques. En général, les cultures d'enrichissement doivent uniquement être ensemencées si les échantillons sont dérivés de sites anatomiques à stérilité primaire. Noter que certains anaérobies stricts nécessitent la présence d'hémine et de vitamine K pour atteindre une croissance optimale. Si la présence de tels microorganismes est attendue, le milieu peut être complémenté avec 10 mg d'hydrochlorure d'hémine et 1 mg de vitamine K1 (ménadione) par litre.

Mode opératoire du test
Le **BD Fluid Thioglycollate Medium** peut généralement être utilisé sans prétraitement supplémentaire. Si plus de 30 % du milieu a été oxydé avant son utilisation (révélé par la coloration rose de l'indicateur résazurine), le milieu peut être réchauffé une fois pendant 5 min, bouchons légèrement desserrés, à la vapeur ou dans de l'eau bouillante, puis refroidi et utilisé. Le milieu étant rempli sous un jet de d'azote gazeux, la ventilation des récipients pendant l'incubation favorise la croissance des bactéries strictement aérobies. La ventilation est assurée en desserrant légèrement les bouchons.

Pour une préparation en microbiologie clinique, le milieu peut être complémenté avec 10 mg d'hydrochlorure d'hémine par litre (préparer une solution mère diluée au 1/10 dans 0,1 N NaOH, stériliser par filtration et ajouter la quantité appropriée dans la fiole) et 1 mg de vitamine K1 par litre (préparer une solution mère diluée au 1/10 dans de l'éthanol absolu, stériliser par filtration et ajouter la quantité appropriée dans la fiole). Les solutions mères d'hémine et de vitamine K peuvent être réfrigérées pendant 4 semaines dans l'obscurité. Dans la mesure où une quantité suffisante de sang ou de sérum provenant de l'échantillon est introduite dans la fiole pendant l'ensemencement, l'incorporation d'un complément est inutile. Ensemencer les échantillons directement dans le milieu et incuber les tubes pendant un maximum de 7 jours à 35 ± 2 °C. Noter que les échantillons doivent aussi être ensemencés directement dans des milieux solides, tels qu'une **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** ou une **BD Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood** et, le cas échéant, dans d'autres milieux sélectifs et non sélectifs. Il convient d'utiliser une **BD Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood** pour l'isolement et la culture d'anaérobies stricts. Le **BD Fluid Thioglycollate Medium** ne produisant pas de résultats optimaux en ce qui concerne l'enrichissement de certains aérobies stricts, un deuxième milieu d'enrichissement liquide , comme un Brain Heart Infusion Broth, peut être ensemencé avec l'échantillon.
Pour le test de stérilité, respecter les recommandations des pharmacopées américaine et européenne et celles émises par certains organismes de contrôle.[3-6] Ces références spécifient le ratio milieu/produit qu'il convient d'appliquer pour les tests de stérilité, et fournissent des détails relatifs à l'échantillonnage et à l'interprétation des résultats de test. Si l'échantillon testé rend le milieu turbide à un point tel qu'il devient difficile d'y observer la croissance microbienne, il convient d'effectuer un transfert vers un nouveau milieu.

Résultats
A l'issue de l'incubation, la croissance bactérienne est mise en évidence par la présence d'une certaine turbidité à l'intérieur des tubes. En cas de doute, repiquer des échantillons appropriés sur des milieux d'étalement. Cette procédure est également recommandée lorsque les microorganismes isolés doivent subir des procédures d'identification supplémentaires. Les microorganismes anaérobies ayant été soumis à une ventilation avant ou pendant la période d'incubation, se développent uniquement dans la couche de bouillon située en-dessous de la couche supérieure oxydée (rose).
Pour isoler des pathogènes à partir d'échantillons cliniques, repiquer 10 à 50 µL de milieu incubé sur une **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** ou une **BD Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood** pour les aérobies et sur une **BD Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood** ou une **BD CDC Anaerobe Agar with 5% sheep blood** pour les anaérobies stricts. Noter qu'il faut impérativement observer les conditions atmosphériques qui conviennent lors des repiquages.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE

Le **BD Fluid Thioglycollate Medium** est utilisé comme milieu d'enrichissement dans de nombreuses applications cliniques ou non cliniques.[3-5,7,8] Grâce à ses puissantes propriétés réductrices, il fournit des conditions adaptées à l'anaérobiose sans qu'une incubation en atmosphère anaérobie soit nécessaire. Pour une mise en évidence optimale des anaérobies exigeants, tels que *Prevotella* spp., le milieu doit être complémenté avec de l'hémine et de la vitamine K1 (voir **Mode opératoire du test**).

Bien que la plupart des aérobies obligatoires (p. ex. *Micrococcus, Pseudomonas* et genres associés, et les *bâtonnets sporulés* strictement aérobies) se développent lorsque les fioles sont ventilées pendant l'incubation (en général la croissance se présente comme une fine pellicule, près de la surface), le Fluid Thioglycollate Medium n'est pas le milieu le mieux adapté à la mise en évidence des aérobies stricts. Pour cela, il convient d'utiliser plutôt un Tryptic Soy Broth ou un Brain Heart Infusion Broth.

Après avoir été réchauffé une fois, le FTM ne doit plus être chauffé à nouveau car cela réduirait la performance microbiologique du milieu.

La croissance obtenue dans ce milieu doit être repiquée dans des milieux solides appropriés, afin de produire des cultures pures qui pourront ensuite être identifiées selon les méthodes adaptées à ce(s) isolat(s).

REFERENCES

1. Brewer, J.H. 1940. Clear liquid medium for the "aerobic" cultivation of anaerobes. J. Am. Med. Assoc. 115:598-600.
2. Vera, H.D. 1944. A comparative study of materials suitable for the cultivation of clostridia. J. Bacteriol. 47:59-70.
3. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. 1999. The U.S. Pharmacopeia 24/The national formulary 19--2000. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md
4. Council of Europe, 1996. European Pharmacopoeia, 3rd edition. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France.
5. Council of Europe, 2000. European Pharmacopoeia, Supplement 2001. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France.
6. Cunniff, P. (ed.). 1995. Official methods of analysis of AOAC International, 16th ed. AOAC International, Gaithersburg, Md.
7. Thomson, R.B., and J.M. Miller. 2003. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.

CONDITIONNEMENT

BD Fluid Thioglycollate Medium: Milieu en flacons prêt à l'emploi
N° réf. 257144 50 unités par carton ; 20 mL, en fiole de 30 mL à bouchon à vis

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Pour plus d'informations, contacter le représentant local de BD.

BD Diagnostic Systems
Tullastrasse 8 – 12
D-69126 Heidelberg/Germany
Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16
Reception_Germany@europe.bd.com

BD Diagnostic Systems Europe
Becton Dickinson France SA
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix/France
Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 http://www.bd.com

BD and BD logo are trademarks of Becton, Dickinson and Company.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
© 2003 Becton, Dickinson and Company